

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.21;577.29

**С-КОНЦЕВОЙ ДОМЕН ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ TnrA ИЗ *Bacillus subtilis* КОНТРОЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА, НО НЕ УЧАСТВУЕТ В ДИМЕРИЗАЦИИ БЕЛКА**

© 2013 г. К. П. Федорова<sup>1\*</sup>, И. С. Шарафутдинов<sup>1</sup>, Е. Ю. Турбина<sup>2</sup>, М. И. Богачев<sup>3</sup>,  
О. Н. Ильинская<sup>1</sup>, А. Р. Каюмов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет ЛЭТИ, Санкт-Петербург, 197376

Поступила в редакцию 28.08.2012 г.

Принята к печати 02.10.2012 г.

Фактор транскрипции TnrA, представитель семейства MerR регуляторов транскрипции, у бактерий *Bacillus subtilis* контролирует гены белков азотного метаболизма в условиях недостатка азота в среде. Как и все ДНК-связывающие белки, он находится в клетках в димерной форме, однако сайт димеризации не установлен. Множественное выравнивание белков гомологов TnrA разных видов бацилл позволило выявить потенциальные сайты димеризации. Получены мутантные белки TnrA с делециями С-концевого домена и показано, что, в отличие от других белков семейства MerR, С-конец белка не отвечает за димеризацию белка. Методом поверхностного плазмонного резонанса установлено, что удаление аминокислотных остатков с С-конца не инактивирует ДНК-связывающую активность этого фактора транскрипции, а наоборот приводит к увеличению аффинности к ДНК. Это позволяет сделать вывод, что С-концевой домен в полном белке участвует в контроле его ДНК-связывающей активности.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, фактор транскрипции TnrA, димеризация.

THE C-TERMINUS OF TRANSCRIPTION FACTOR TNRA FROM *BACILLUS SUBTILIS* CONTROLS DNA-BINDING DOMAIN ACTIVITY BUT IS NOT REQUIRED FOR DIMERIZATION, by K. P. Fedorova<sup>1\*</sup>, I. S. Sharafutdinov<sup>1</sup>, E. Y. Turbina<sup>2</sup>, M. I. Bogachev<sup>3</sup>, O. N. Ilinskaja<sup>1</sup>, A. R. Kayumov<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008 Russia, \*e-mail: kpfedorova@gmail.com; kairatr@yandex.ru; <sup>2</sup>Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia; <sup>3</sup>Saint-Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint-Petersburg, 197376 Russia). The transcription factor TnrA, which belongs to the MerR transcription regulators, in *Bacillus subtilis* cells controls genes of nitrogen metabolism under conditions of nitrogen limitation. As all the DNA-binding proteins, it is present as a dimer in cells, but the dimerization site is still unknown. The multiple alignment of TnrA homologs from the other *Bacilli* allowed to identify the putative dimerization sites. Using the C-terminal truncated TnrA proteins it is established, that, in contrast to other MerR-proteins, the TnrA C-terminus does not participate in dimerization. The surface plasmon resonance has revealed that C-terminus truncations of TnrA do not inactivate its DNA-binding activity. By contrary, it increased an affinity to DNA, confirming that C-terminus controls the DNA-binding activity in a full-length TnrA.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, transcription factor TnrA, dimerization.

DOI: 10.7868/S0026898413020055

В клетках бактерий активность множества генов контролируется ДНК-связывающими белками – факторами транскрипции, которые, взаимодействуя с промоторной областью гена, активируют или, наоборот, подавляют его транскрипцию в ответ на изменение условий окружающей среды. В клетках *B. subtilis* фактор транскрипции TnrA кон-

тролирует гены белков азотного метаболизма в условиях недостатка азота в среде [1]. Находясь в димерной форме, он взаимодействует с палиндромной последовательностью в промоторах генов-мишеней. Этот белок относится к семейству MerR регуляторов транскрипции, большинство которых имеет сходную третичную структуру и

Принятые сокращения: ППР – метод поверхностного плазмонного резонанса.

\* Эл. почта: kpfedorova@gmail.com; kairatr@yandex.ru

контролирует клеточный метаболизм в ответ на изменение в среде концентрации различных металлов [2]. Белки семейства MerR находятся в клетках в димерной форме и имеют два функциональных домена [2]. При этом N-концевой домен взаимодействует с ДНК, а С-концевой воспринимает регуляторный сигнал. Несмотря на высокую гомологию ДНК-связывающего N-концевого домена, С-концевой домен белка TnrA значительно короче, чем у белков семейства MerR [3]. Тем не менее, С-конец белка TnrA взаимодействует с белком GlnK и глутаминсинтетазой, что подтверждает его участие в передаче регуляторного сигнала [3, 4].

В настоящее время открыт вопрос о сайте димеризации белка TnrA [3, 4]. Ранние исследования показали, что удаление до 27 аминокислот с С-конца белка не нарушает димеризацию белка, хоть и приводит к удалению  $\alpha$ -спирали, имеющей высокую гомологию с областью димеризации ряда белков семейства MerR [1, 3, 5]. В данной работе мы приводим модель возможной димеризации фактора транскрипции TnrA, которая отличается от димеризации других белков семейства MerR, а также показываем, что С-концевой домен в полноценном белке участвует в контроле его ДНК-связывающей активности и необходим для стабилизации комплекса TnrA-ДНК.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы и плазмиды.** Клонирование гена *tnrA* проводили в штамме *E. coli* XLI-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*), ("Stratagene", США). Штамм *E. coli* BL21 использовали для гиперэкспрессии целевых белков. Вектор pET15b ("Novagen") реплицируется в клетках *E. coli*, несет сильный промотор фага T7 под контролем *lac*-оператора и обеспечивает гиперэкспрессию рекомбинантных белков с образованием гексагистидинового участка на N-конце белка в клетках *E. coli* BL21. Плазмиды pET15b-TnrA6, pET15b-TnrA20 и pET15b-TnrA35 получены ранее [4], получение плазмиды pET15b-TnrA43 описано ниже. Плазмида pET15b-TnrA несет полноразмерный ген фактора транскрипции TnrA *B. subtilis* 168 [6]. Плазмиды pET15b, pET15b-TnrA и штамм *E. coli* BL21 предоставлены профессором Карлом Форшхаммером (Университет Тюбингена, Германия).

**Культивирование бактерий.** Культивирование штаммов *E. coli* проводили на среде LB. При выращивании рекомбинантных штаммов *E. coli* в среду вносили ампициллин до конечной концентрации в среде 100 мкг/мл.

**Конструирование плазмиды pET15b-TnrA43.** Мутантный ген *tnrA43* амплифицировали с хромосомной ДНК *B. subtilis* 168 с использованием синтетических олигонуклеотидов TnrAN (5'-GCT CGA GGA TCC GAT GAC CAC AGA AGA TCA

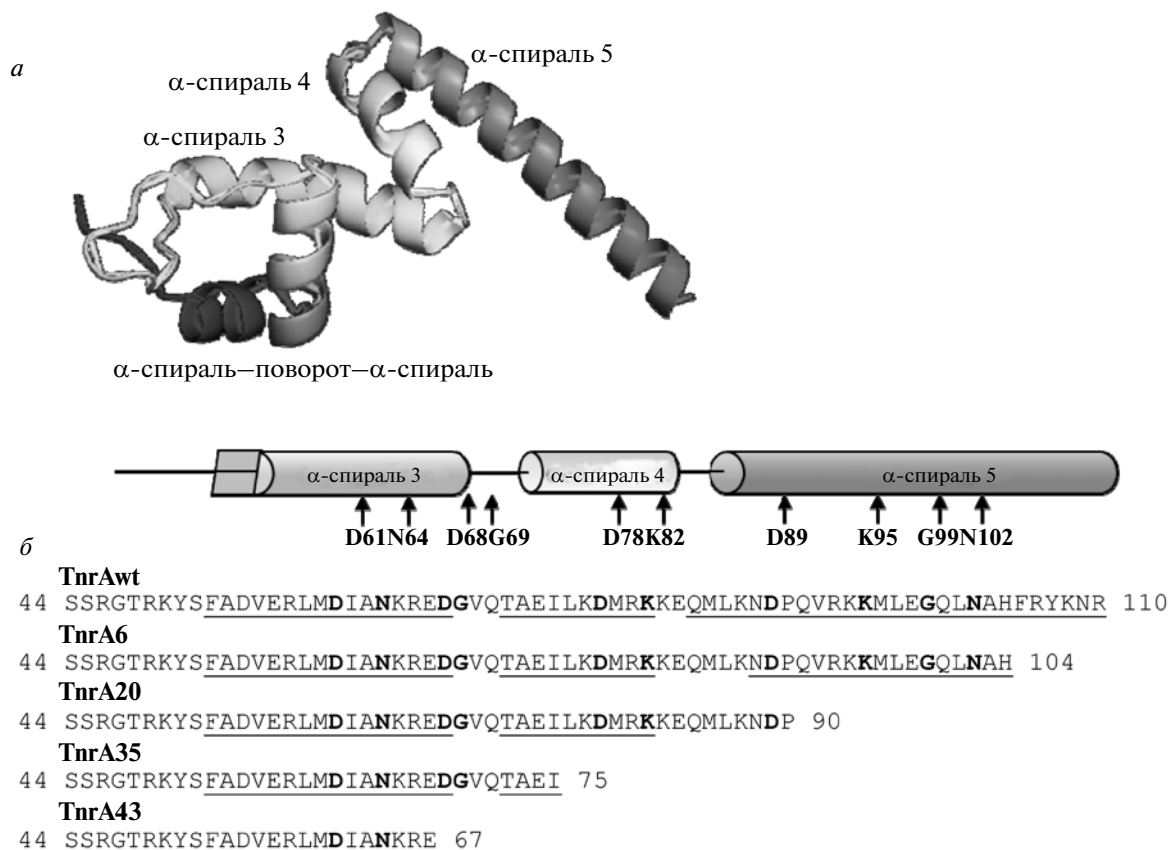
TTC TT-3') и TnrA43 (5'-TGC CGT GGA TCC GCC TTA TTC ACG CTT ATT G-3'). Сайт рестрикции BamHI подчеркнут. Продукт амплификации рестрицировали по сайтам BamHI и лигировали с вектором pET15b, предварительно линезализованным по тому же сайту. Отсутствие ошибок в клонированной последовательности подтверждено секвенированием.

**Гиперпродукция и очистка белков TnrA.** Очистку нативного и рекомбинантных белков TnrA с гексагистидинового последовательностью на N-конце белка проводили на Ni-NTA сефарозе, как описано в работах [4, 6].

**Анализ олигомеризации белков TnrA методом поперечных сшивок.** Способность рекомбинантных белков TnrA к димеризации определяли методом поперечных сшивок в присутствии глутарового альдегида в качестве сшивающего агента [7]. Продукты реакции сшивки анализировали в 15%-ном SDS-ПААГ [8] с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против белка TnrA [6].

**Анализ ДНК-связывающей активности TnrA.** Изучение ДНК-связывающей активности белка TnrA проводили методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIACore X (Biacore AB, Швеция). В качестве специфической последовательности ДНК использовали олигонуклеотиды с модификацией в виде биотина на 5'-конце, содержащие TnrA-узнаваемый участок промотора гена *nrgA* (5'-биотин-AAAACCATGTCAGGAAA-TCTTACATGAAAA-3') и комплементарные олигонуклеотиды без модификации (5'-TTTTT ATGTA AGATT TCCTG ACATG G TTTT-3'). Контролем служили олигонуклеотидные фрагменты гена устойчивости к ампициллину на плазмиде pET15b, в которых отсутствовала TnrA-узнаваемая последовательность (5'-биотин-CAGTG AGGCA CSTAT CTCAG CGATC TGTCT-3', 5'-AGACA GATCG CTGAG ATAGG TGCCT CACTG-3'). Гибридизацию олигонуклеотидов проводили как описано в работе [9]. Далее иммобилизовали готовые ДНК-дуплексы на сенсорной поверхности SA чипа (Biacore AB). Иммобилизацию ДНК-дуплексов и анализ ДНК-связывающей способности белков TnrA проводили при 25°C в буфере HBS (10 mM HEPES, 300 mM NaCl, EDTA 0.2 mM, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.005% Nonidet P-40, pH 7.4). Канал 1 (FC1) чипа использовали в качестве контрольного и наносили на него неспецифические ДНК-дуплексы, канал 2 (FC2) использовали в качестве опытного и иммобилизовали на его поверхности специфические ДНК-дуплексы. Наносили ДНК-дуплексы со скоростью 10 мкл/мин на каждый канал SA чипа до количества ДНК на поверхности, равного 1800 резонансных единиц (РЕ). Специфическое взаимодействие анализируемых белков с молекулами ДНК определяли



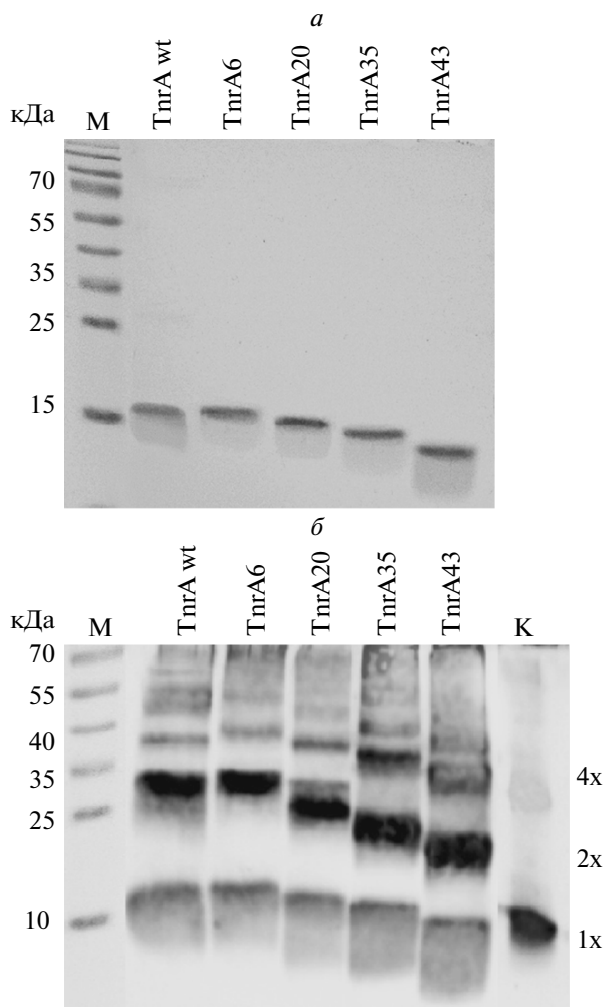


**Рис. 2.** Предполагаемая вторичная и третичная структура фактора транскрипции TnrA, полученная на основе аминокислотной последовательности белка (*a*) и делеции С-концевого домена фактора транскрипции TnrA на 6, 20, 35 и 43 аминокислотных остатков (*b*). Жирным выделены аминокислоты, предположительно участвующие в димеризации белка TnrA.

исходит по С-концевой  $\alpha$ -спирали, удаление гомологичного домена фактора TnrA не приводит к нарушению его димеризации [3, 4]. Мы предположили, что, возможно, димеризация белка TnrA происходит в его центральной части, так как N-конец формирует ДНК-связывающий домен [3]. Чтобы установить сайт димеризации TnrA, мы сначала провели сравнительный анализ его аминокислотной последовательности с ближайшими белками-гомологами из других видов бацилл. В результате выявлены аминокислоты, потенциально участвующие в димеризации этого белка (рис. 1): D61, N64, D68, G69, D78, K82, D89, K95, G99 и N102. Идентифицированные аминокислоты образуют несколько вероятных участков взаимодействия мономеров TnrA. Эти сайты состоят из полярных остатков аминокислот и находятся в каждой из трех  $\alpha$ -спиралей, а также между  $\alpha$ -спиралями 3 и 4 (рис. 2). Наиболее вероятными точками взаимодействия могут быть пары D78K82 и D89K95, состоящие каждая из двух полярных аминокислот с противоположным зарядом, которые при димеризации белков семейства MerR оказываются друг напротив друга в противоположно направ-

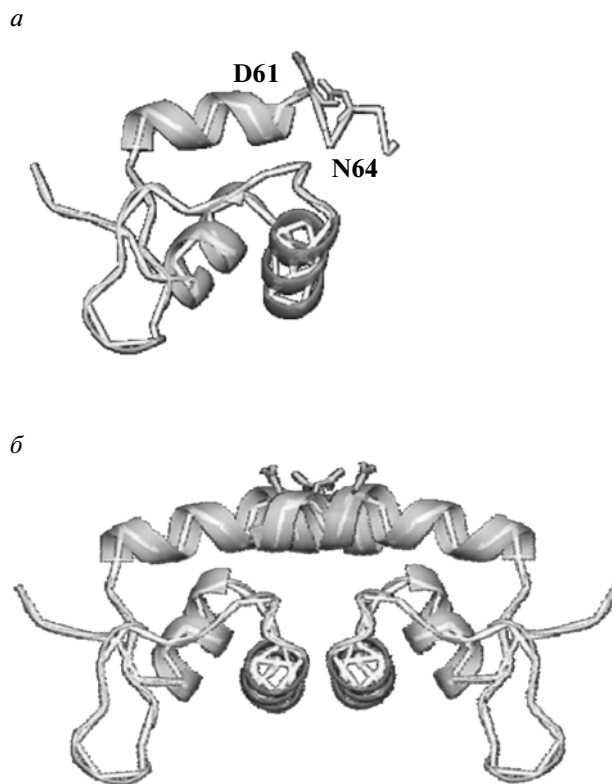
ленных молекулах мономеров [2]. Однако результаты прежних работ показали, что удаление С-концевой спирали не нарушает димеризацию [3, 4], следовательно, взаимодействие двух противоположно направленных мономеров наиболее вероятно по  $\alpha$ -спиралям 3 и 4, возможно по остаткам D78K82, что теоретически не препятствует взаимодействию белков GlnK и глутаминсинтетазы с С-концом TnrA [3, 4]. Чтобы установить сайт димеризации фактора TnrA в клетках *E. coli*, экспрессировали и далее очищали до электрофоретической гомогенности укороченные мутантные белки TnrA, у которых отсутствует часть С-концевой области (рис. 3а) [4]. Каждая из мутаций последовательно удаляла потенциальные сайты димеризации с С-конца (рис. 2б). Мутантный белок TnrA с делецией 50 аминокислот с С-конца и полным удалением всех возможных сайтов оказался крайне нестабильным в клетках *E. coli* и не мог быть очищен (не показано).

Проверку димеризации рекомбинантных белков осуществляли методом поперечных сшивков (рис. 3б). Результаты анализа продемонстрировали способность к олигомеризации всех мутант-



**Рис. 3.** Электрофорез в SDS-ПААГ очищенных белков TnrA wt-His<sub>6</sub>, TnrA6-His<sub>6</sub>, TnrA20-His<sub>6</sub>, TnrA35-His<sub>6</sub> (а) и TnrA43-His<sub>6</sub> и анализ мутантных белков TnrA методом поперечных сшивок (б). К – белок TnrA wt-His<sub>6</sub> в отсутствии глутарового агента. 1x, 2x, 4x – белки в мономерной, димерной и тетрамерной формах.

ных белков. Ранее также показано, что 27 аминокислотных остатков с С-конца белка TnrA не отвечают за димеризацию молекул [3]. Эти данные свидетельствуют о том, что вероятно 8 из 10 предполагаемых аминокислот С-конца (D68, G69, D78, K82, D89, K95, G99, N102) не являются критичными для димеризации и, скорее всего, в ней не участвуют. Таким образом, наиболее вероятно, что димеризация белка идет по  $\alpha$ -спирали 3 (рис. 2а). Мы провели моделирование третичной структуры и возможной димеризации белка TnrA43 (рис. 4). Видно, что взаимодействие двух противоположно направленных  $\alpha$ -спиралей происходит по остаткам аспарагиновой кислоты 61 и аспарагина 64. Подобная структура нехарактерна для белков-гомологов MerR, которые димеризуются по  $\alpha$ -спиралям 4 или 5, образуя подвижную структуру [2].

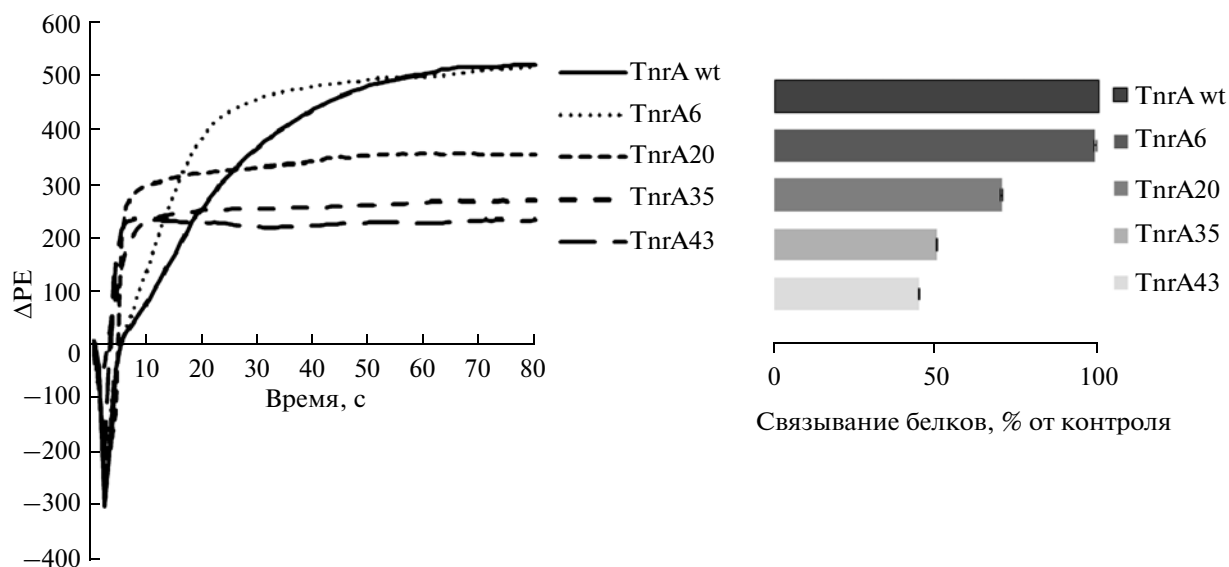


**Рис. 4.** Предполагаемая третичная структура мутантного белка TnrA43 (а) и модель его димеризации (б).

Несмотря на высокую гомологию, белок TnrA обладает другой четвертичной структурой. Вероятно, это связано с различиями в механизмах передачи сигнала, тогда как эффекторами для белков MerR являются ионы металлов, связывающиеся с С-концевым доменом, белок TnrA взаимодействует с белком GlnK и глутаминсинтетазой [3, 4].

#### ***С-концевой домен фактора TnrA контролирует активность ДНК-связывающего домена***

В ряде работ показана необходимость С-конца белка TnrA для контроля его активности и взаимодействия с регуляторными белками [3, 4, 16]. Тем не менее, неизвестно о ДНК-связывающей активности мутантных белков и роли С-концевого домена в контроле ДНК-связывающей активности N-концевого домена [3]. Согласно нашей модели димеризации белка TnrA, удаление С-конца не должно нарушать конформацию ДНК-связывающего домена. Чтобы проверить это, мы исследовали ДНК-связывающую активность TnrA методом поверхностного плазмонного резонанса. Специфическое взаимодействие TnrA с промотором TnrA-зависимого гена определяли как разницу между взаимодействием TnrA со специфичной и неспецифичной последовательностями ДНК. В качестве специфической последователь-



**Рис. 5.** Анализ взаимодействия полноценного и мутантных белков TnrA с промотором TnrA-зависимого гена *nrgA* методом поверхностного плазмонного резонанса. Эффективность связывания мутантных белков с ДНК показана в резонансных единицах, а также в % (связывание TnrA wt с ДНК принято за 100%).

ности ДНК использовали олигонуклеотиды, содержащие TnrA-узнаваемый участок промотора гена *nrgA* (TGTNAN<sub>7</sub>TNACA), в неспецифической последовательности отсутствовал такой участок.

На поверхность сенсорного чипа наносили равномолярные концентрации белков (200 нМ) в пересчете на молекулярную массу каждого белка (димера). Все мутантные белки TnrA с делециями С-конца сохраняли способность взаимодействовать с ДНК (рис. 5), при этом, по мере удаления аминокислот с С-конца, возрастала скорость связывания, о чем свидетельствует увеличение угла наклона кривой связывания. Подобный эффект описан для белка Spo0A из *B. subtilis*: удаление регуляторного домена приводило к конститутивному связыванию белка с ДНК без фосфорилирования, которое необходимо нативному белку для приобретения сродства к ДНК [17]. Однако при удалении уже 20 аминокислот (что соответствует

удалению  $\alpha$ -спирали 5) происходило снижение конечного уровня накопления сигнала и более чем двухкратное увеличение константы диссоциации (таблица). С удалением 43 аминокислот константа диссоциации возрастала в пять раз по сравнению с исходным белком. Это свидетельствует о том, что наряду с высокой скоростью связывания белка с ДНК происходит его быстрая диссоциация, что свидетельствует о снижении стабильности данного комплекса. Тем не менее, равновесная константа диссоциации изменялась незначительно (таблица). Вопрос о возможности инициации транскрипции мутантными белками также открыт. В работе [16] авторы наблюдали TnrA-нуль-фенотип клеток, образующих белок TnrA с удалением уже 35 аминокислот. Вероятно, несмотря на возможность связывания этого белка с ДНК и незначительного снижения его аффинности, силы взаимодействия недостаточно для адаптации ДНК к продуктивной инициации транскрипции. По-видимому,  $\alpha$ -спираль 5 (рис. 2a) одновременно участвует как в стабилизации комплекса TnrA-ДНК, так и определяет ее аффинность к ДНК. Ранее показано, что именно в этой области происходит взаимодействие TnrA с регуляторным белком GlnK и глутаминсинтетазой [3, 4]. В совокупности эти результаты подтверждают предположение о роли С-концевого домена, как домена передачи регуляторного сигнала и контроля ДНК-связывающей активности фактора транскрипции TnrA.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федераль-

Кинетические константы  $k_a$  и  $k_d$  и вычисленные равновесные константы диссоциации  $K_D$

| Белки   | Константы скорости                         |                                 | $K_D$ , М                |
|---------|--------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
|         | $k_a \times 10^4$ , $M^{-1} \times c^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3}$ , $c^{-1}$ | $k_d/k_a \times 10^{-8}$ |
| TnrA wt | $2.8 \pm 0.61$                             | $1.4 \pm 0.06$                  | $5.0 \pm 0.96$           |
| TnrA6   | $4.2 \pm 0.2$                              | $1.7 \pm 0.06$                  | $4.1 \pm 0.26$           |
| TnrA20  | $8.1 \pm 2.5$                              | $2.8 \pm 0.01$                  | $3.5 \pm 0.6$            |
| TnrA35  | $13 \pm 0.81$                              | $4.4 \pm 0.01$                  | $3.4 \pm 0.55$           |
| TnrA43  | $15 \pm 1.5$                               | $5.0 \pm 0.01$                  | $3.4 \pm 0.42$           |

ной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (№ 14.В37.21.0160), гранта Минобрнауки России и Германской службы академических обменов (DAAD) по программе “Михаил Ломоносов” А/10/74537 и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 12-04-01226-а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wray L.V., Ferson A.E., Rohrer K., Fisher S.H. 1996. TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 8841–8845.
2. Hobman J.L. 2007. MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Mol. Microbiol.* **63**, 1275–1278.
3. Wray L.V. Jr., Fisher S.H. 2007. Functional analysis of the carboxy-terminal region of *Bacillus subtilis* TnrA, a MerR family protein. *J. Bacteriol.* **189**, 20–27.
4. Kayumov A., Heinrich A., Fedorova K., Ilinskaya O., Forchhammer K. 2011. Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* **278**, 1779–1788.
5. Changela A., Chen K., Xue Y., Holschen J., Outten C.E., O’Halloran T.V., Mondragón A. 2003. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science*. **301**, 1383–1387.
6. Heinrich A., Woyda K., Brauburger K., Meiss G., Detsch C., Stülke J., Forchhammer K. 2006. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 34909–34917.
7. Fokina O., Herrmann C., Forchhammer K. 2011. Signal-transduction protein P(II) from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 senses low adenylate energy charge in vitro. *J. Biochem.* **440**, 147–156.
8. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
9. Hart D.J., Speight R.E., Cooper M.A., Sutherland J.D., Blackburn J.M. 1999. The salt dependence of DNA recognition by NF-kappaB p50: a detailed kinetic analysis of the effects on affinity and specificity. *Nucl. Acids Res.* **27**, 1063–1069.
10. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673–4680.
11. Altshul J.H., Marshall G., Morgan L.A., Baumgartner J.C. 1997. Comparison of dentinal crack incidence and of post removal time resulting from post removal by ultrasonic or mechanical force. *J. Endod.* **23**, 683–686.
12. Stothard P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*. **28**, 1102–1104.
13. Kelley L.A., Sternberg M.J. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–371.
14. Gunka K., Commichau F.M. 2012. Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Mol. Microbiol.* **85**, 213–224.
15. Каюмов, А.Р., Федорова К.П., Ильинская О.Н., Шарипова М.Р. 2010. Содержание и локализация регуляторных белков TnrA и GlnK в клетках *Bacillus subtilis* в условиях азотного голодания. *Молекуляр. биология*. **44**, 743–745.
16. Shin B.S., Choi S.K., Smith I., Park S.H. 2000. Analysis of *tnrA* alleles which result in a glucose-resistant sporulation phenotype in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**, 5009–5012.
17. Fujita M., Sadaie Y. 1998. Feedback loops involving Spo0A and AbrB in *in vitro* transcription of the genes involved in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* **124**, 98–104.